

PRODUCTION OF S-()-MANDELAMIDE AND DERIVATIVE THEREOF

Patent Number: JP4222591
Publication date: 1992-08-12
Inventor(s): ENDO RYUICHI; others: 01
Applicant(s): NITTO CHEM IND CO LTD
Requested Patent: ☐ JP4222591
Application Number: JP19900411807 19901220
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P13/02; C12P41/00
EC Classification:
Equivalents: JP3081649B2

Abstract

PURPOSE: To industrially and advantageously obtain the title compound useful as a synthetic raw material for medicines and agricultural chemicals by treating a mixture of a mandelonitrile or a benzaldehyde of racemic modification and prussic acid with a bacterium capable of hydrating a nitrile group.

CONSTITUTION: A mixture of a mandelonitrile of racemic modification shown by formula I (X is H, methyl, methoxy, hydroxyl or halogen) or a derivative thereof (e.g. 2-chloromandelonitrile) or a benzaldehyde shown by formula II or a derivative thereof (e.g. 2-chlorobenzaldehyde) of racemic modification and prussic acid is treated in a neutral or basic polar solvent with a bacterium [e.g. *Rhodococcus* sp. PN 42-2 (FERM P-11,775)] capable of stereospecifically hydrating nitrile group of the mandelonitrile of racemic modification shown by formula I or the derivative thereof or a treated material thereof to directly give an advantageously amount of optically active S-(+)-mandelamide shown by formula III or a derivative thereof.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

(19)日本国特許庁(JP)

(12)公開特許公報(A)

(11)特許出願公開番号

特開平4-222591

(43)公開日 平成4年(1992)8月12日

(51)IntCl. ⁵	識別記号	庁内整理番号	FI	技術表示箇所
C 1 2 P 13/02		6977-4B		
41/00	H	8828-4B		
// (C 1 2 P 13/02				
C 1 2 R 1:01)				
(C 1 2 P 41/00				

審査請求 未請求 請求項の数2(全 6 頁) 最終頁に続く

(21)出願番号 特願平2-411807

(22)出願日 平成2年(1990)12月20日

(71)出願人 000003953

日東化学工業株式会社

東京都千代田区丸の内1丁目5番1号

(72)発明者 遠藤 隆一

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日

東化学工業株式会社中央研究所内

(72)発明者 田村 鋼二

神奈川県横浜市鶴見区大黒町10番1号 日

東化学工業株式会社中央研究所内

(54)【発明の名称】 S-(+)-マンデルアミドおよびその誘導体の製造法

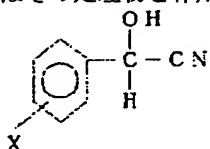
(57)【要約】

【構成】ラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、またはベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物に、中性または塩基性の極性媒体中で、該ラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体のニトリル基を立体特異的に水和する能力を有する微生物またはその処理物を作用させることにより、光学活性なS-(+)-マンデルアミドまたはその誘導体を生成せしめる。

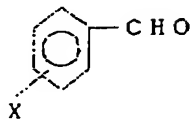
【効果】ラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、またはベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物から直接優位量(50~100%)のS-(+)-マンデルアミドが製造できる。

【特許請求の範囲】

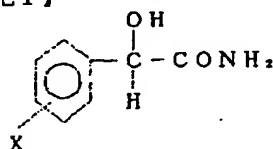
【請求項1】 下記一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、または下記一般式(2)で示されるベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物に、中性または塩基性の極性媒体中で、該一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体のニトリル基を立体特異的に水和する能力を有する微生物またはその処理物を作用させることに



(1)



(2)



(3)

〔Xは水素、メチル基、メトキシ基、ヒドロキシ基およびハロゲンを表わす。〕

【請求項2】 微生物がロドコッカス(Rhodococcus)属に属する微生物である請求項1記載の製造法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は微生物を用いてマンデロニトリルおよびマンデロニトリル誘導体等から対応するS-(+)-マンデルアミドおよびS-(+)-マンデルアミド誘導体を製造する方法に関する。S-(+)-マンデルアミドおよびその誘導体は加水分解することによりS-(+)-マンデル酸およびその誘導体に変換することができる。S-(+)-マンデルアミドおよびS-(+)-マンデル酸ならびにこれらの誘導体は医・農薬の合成原料として重要な物質である。

【0002】

【従来技術】微生物によりニトリル化合物を水和して対応するアミドを生産する技術に関する発明は多く、特公昭56-17918号、特公昭59-37951号、特開昭62-91189号および特開昭61-162194号公報などが有る。しかしこれらの報告は不斉炭素を分子内に持たないニトリル化合物を対象としたものである。

【0003】不斉炭素を分子内に有するニトリルからのアミドの生産に関しては、バチルス属、バクテリジウム属、マイクロコカス属、プレビバクテリウム属に属する微生物をD、L-α-アミノニトリルに作用させL-α-アミノ酸とD-α-アミノアミドの混合物を得る方法(特表昭56-50031号公報参照)、プレビバクテリウム属R312株のA4変異株を用いてラセミ体のα-アミノ-γ-メチルチオブチロニトリル、α-アミノプロピオニトリル、α-アミノブチロニトリル、α-アミノ-β-フェニルプロピオニトリル、α-アミノ-γ-メチルベンチルニトリルおよびα-アミノイソバレロニトリルから対応するL-体のアミノ酸とD-体のア

より、原料の一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、または一般式(2)で示されるベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物から直接優位量の下記一般式(3)で示される光学活性なS-(+)-マンデルアミドまたはその誘導体を生産せしめることを特徴とするS-(+)-マンデルアミドおよびその誘導体の製造法。

【化1】

ミノアミドを50%づつの混合比で得る方法[Adv. Biochem. Engineer. 14 1(1980)参照]、シュードモナス属、ロドコッカス属、ノカルディア属によるD、L-アミノニトリルから光学活性なα-アミノ酸および/またはα-アミノアミドを生産する方法(特開平2-31694号公報参照)およびD、L-α-アミノニトリルから立体特異的加水分解酵素により約40%eeのL-α-アミノアミドを得る方法(特表昭63-50004号公報参照)などが知られている。

【0004】

【発明が解決しようとする問題点】これらの方法を利用して光学活性アミドを得るには、共存しているアミノ酸との分離操作が煩雑であり、また原理的にアミドの収率が基質の半分にしかならないという問題点があった。

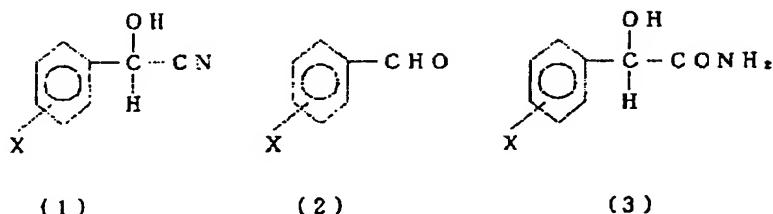
【0005】

【発明の構成】本発明者らは、上記状況に鑑み光学活性マンデルアミドおよびその誘導体の効率良い生産方法を開発すべく研究を重ねた結果、微生物を用いて、マンデロニトリルおよびその誘導体、またはベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物から、そのほぼ全てをS-(+)-マンデルアミドおよびその誘導体に変換し得ることを見出し本発明を完成した。

【0006】すなわち、本発明は、下記一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、または下記一般式(2)で示されるベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物に、中性または塩基性の極性媒体中で、該一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体のニトリル基を立体特異的に水和する能力を有する微生物またはその処理物を作用させることにより、原料の一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、または一般式(2)で示されるベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物から直接優位量の下記一般式(3)で示される光学活性なS-(+)-マンデルアミドまたはその誘導体を生産せしめることを特徴とするS

— (+) — マンデルアミドおよびその誘導体の製造法、
である。

【化 2】



【Xは水素、メチル基、メトキシ基、ヒドロキシル基およびハロゲンを表わす。】

【0007】上記したところを要旨とする本発明は、一般式(1)で示されるマンデロニトリルおよびその誘導体が、中性ないし塩基性の極性媒体中で解離平衡することにより容易にラセミ化することを利用し、このラセミ化反応の系と一般式(1)で示されるラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体のニトリル基を立体特異的に水和する能力を有する微生物を共役させることにより、原理的に全ての基質を化学量論的にS—(+)—マンデルアミドおよびその誘導体に変換し得るとの本発明者らにより見出された知見に基づくものである。

10 【0008】本発明に用いられる微生物は、例えばロドコッカス属に属するもので具体的にはロドコッカス s p. HN6-1 (微工研菌寄第11773号)、ロドコッカス s p. HT40-6 (微工研菌寄第11774号) およびロドコッカス s p. PN42-2 (微工研菌寄第11775号) の菌株を挙げることができる。これらの微生物はいずれも本発明者らにより新たに見出されたものであり、工業技術院微生物工業技術研究所に上記番号にて寄託されており、各々の菌学的性質は以下に示すとおりである。

20 【表 1】

試験項目	試 験 結 果		
	HN6-1	HT40-6	PN42-2
形 態	多形性桿菌	多形性桿菌	多形性桿菌
グラム染色性	+	+	+
芽 胞	—	—	—
運 動 性	—	—	—
集落の色調	色素の生成認めず	赤味を帯びたオレンジ色	赤味を帯びたピンク色
集落周辺細胞の伸長	認める	認める	認める
オキシダーゼ	+	+	+
カタラーゼ	+	+	+
酸素に対する態度	好気性	好気性	好気性
細胞壁のジアミノ酸	meso-ジアミノピメリン酸	meso-ジアミノピメリン酸	meso-ジアミノピメリン酸
グリコリル試験	+(グリコリル型)	+(グリコリル型)	+(グリコリル型)
細胞壁の糖組成			
アラビノース	+	+	+
ガラクトース	+	+	+
キノ ン 系	MK-8(H ₂)	MK-8(H ₂)	MK-8(H ₂)

【0009】以上の菌学的性質をバージェイズ マニュアル オブ システマティック バクテリオロジー (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986) に従って分類すると3株ともロドコッカス属に属する細菌と同定された。

【0010】次に本発明の実施態様について説明する。

45 本発明に使用される微生物の培養は資化し得るグルコース、グリセロール、サッカロースなどの炭素源、尿素、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウムなどの窒素源、生育に必須の塩化マグネシウム、塩化カルシウム、塩化鉄などの無機栄養素などを含有した通常の培地を用いて行なわれる。またこれらの培地に酵母エキス、肉エキス、

糖蜜などの天然培地を添加したものも使用することができる。培養初期から中期に生育を大きく阻害しない濃度のベンゾニトリル、ベンジルシアニド、イソブチロニトリルなどのニトリル類、またはイソブチルアミド、フェニルアセトアミドなどのアミド類を酵素誘導物質として添加することにより高い酵素活性が得られる。

【0011】使用する培地のpHは4~10、培養温度は5~50℃の範囲で選べばよく、培養は1~14日程度好氣的に行い活性が最大となるまで継続すればよい。

【0012】一般式(1)で示されるマンデロニトリル等の水和反応は、上記の方法にて培養した微生物の菌体または菌体処理物(菌体の破砕物、粗・精製酵素、固定化菌体・酵素等)を極性媒体、例えば水または緩衝液などの水性媒体中で、マンデロニトリルまたはその誘導体、あるいはベンズアルデヒドまたはその誘導体と青酸との混合物に接触させることによって行なわれる。

【0013】本発明においては前述のように基質であるマンデロニトリルまたはその誘導体をラセミ化するために反応系を中性付近ないしは塩基性に保つことが必須でありpH4~11、好ましくはpH6~10に調整する。基質の濃度はベンズアルデヒドや青酸に対する酵素の感受性により一概に特定し得ないが、通常、反応液中のマンデロニトリルおよびその誘導体は0.1~10重量%、好ましくは0.2~5.0重量%、ベンズアルデヒドまたはその誘導体は0.1~10重量%、好ましくは0.2~5.0重量%、青酸は0.1~1.0重量%、好ましくは0.1~0.5重量%である。原料となる基質に対する微生物等の使用量は乾燥菌体として0.01~5.0重量%、反応温度は0~50℃、好ましくは10~30℃、反応時間は0.1~24時間程度である。

【0014】かくして、ラセミ体のマンデロニトリルおよびその誘導体、またはベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物から高収率で光学活性S-(+)-マンデルアミドが生産、蓄積される。生成物の単離は濃縮、抽出、晶析などの公知の方法を利用して行うことができる。

【0015】

【発明の効果】本発明によれば、ラセミ体のマンデロニ

表 1

菌 株	マンデルアミド生成量 (mM)	光学純度 S-(+)体(%ee)
ロドコッカス s.p. PN42-2	10.6	99
ロドコッカス s.p. HN6-1	12.8	75
ロドコッカス s.p. HT40-6	13.3	99

トリルおよびその誘導体、またはベンズアルデヒドおよびその誘導体と青酸の混合物から直接優位量(50~100%)のS-(+)-マンデルアミドが製造でき、原料の全てを化学量論的にS-(+)-マンデルアミドに変換することも可能であり極めて効率の良いS-(+)-マンデルアミドとその誘導体の製造方法を提供し得る。

【0016】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが該実施例は本発明を限定するものではない。

【0017】実施例1(1)培養下記平板培地にロドコッカス s.p. PN42-2、同HN6-1および同HT40-6の3株を各々接種し30℃で72時間好氣的に培養した。

15 【0018】培地(pH7.5)グリセロール
5g

酵母エキス0.2g

ベンジルシアニド 0.5g

K₂HPO₄ 5g MgCl₂ 0.2g

20 CaCl₂ 40mg

MnSO₄ · 4H₂O 4mg

FeCl₃ · 7H₂O 0.7mg

ZnSO₄ · 7H₂O 0.1mg

蒸留水 1000ml

25 【0019】(2)水和反応培地から菌体を採取し、遠心分離により各々の菌体を20mMリン酸緩衝液(pH7.5)で3回洗浄した。沈殿菌体を14mMマンデロニトリルを含む1.5mlの上記緩衝液に懸濁し、30℃で15時間振盪しながら反応を行った。使用した菌体濃度はOD₆₁₀=1.5~3.0であった。反応終了後、各々の反応液を遠心分離し菌体を除去した後、上清中のマンデルアミド含量を液体クロマトグラフィー(カラム; SHODEX ODSF511A, キャリヤ; 0.2M H₃PO₄; アセトニトリル=4:1, モニター; 208nm)で分析した。また生成したマンデルアミドの光学純度は光学分割用カラム(CHIRALCEL CA-1, ダイセル化学工業、キャリヤ; 100%エタノール)を用いて測定した。結果を表1に示した。

【表2】

【0020】実施例2ロドコッカス s.p. HT40- 50 6株を実施例1と同様に培養、採取し遠心分離により洗

浄した。沈殿菌体をそれぞれ14mMの2-クロルマンデロニトリル、3-クロルマンデロニトリル、4-クロルマンデロニトリル、4-ブロムマンデロニトリル、4-ヒドロキシマンデロニトリル、4-メチルマンデロニトリルおよび4-メトキシマンデロニトリルを含む1.5mlの20mMりん酸緩衝液(pH7.5)に懸濁

し、30℃で15時間振盪しながら反応を行った。使用した菌濃度は $OD_{610} = 2.2$ であった。反応終了後、遠心分離により菌体を除去した上清中に含まれるマンデルアミド誘導体の定量と光学純度の測定は実施例1に示した方法で行った。結果を表2に示した。

【表3】

表 2

基 質	マンデルアミド誘導体 生成量 (mM)	光学純度 S-(+)-体 (%ee)
2-クロルマンデロニトリル	12.2	99
3-クロルマンデロニトリル	10.1	98
4-クロルマンデロニトリル	8.9	98
4-ブロムマンデロニトリル	3.5	92
4-ヒドロキシマンデロニトリル	9.7	95
4-メチルマンデロニトリル	5.2	97
4-メトキシマンデロニトリル	4.6	97

【0021】実施例3ロドコッカス sp. HN6-1株および同PN42-2株を実施例1と同様に培養、採取し遠心分離により洗浄した。沈殿菌体をそれぞれ14mMの2-クロルマンデロニトリル、3-クロルマンデロニトリルおよび4-クロルマンデロニトリルを含む1.5mlの20mMりん酸緩衝液(pH7.5)に懸

濁し、30℃で15時間振盪しながら反応を行った。使用した菌濃度はHN6-1株が $OD_{610} = 2.1$ 、PN42-2株が $OD_{610} = 1.7$ であった。生成したマンデルアミド誘導体の定量と光学純度の測定は実施例1に示した方法で行った。結果を表3に示した。

【表4】

表 3

菌 株	基 質	マンデルアミド誘導体 生成量 (mM)	光学純度 S-(+)-体 (%ee)
ロドコッカス sp. HN6-1	2-クロルマンデロニトリル	12.3	73
	3-クロルマンデロニトリル	11.8	75
	4-クロルマンデロニトリル	11.5	74
ロドコッカス sp. PN42-2	2-クロルマンデロニトリル	9.6	98
	3-クロルマンデロニトリル	8.4	97
	4-クロルマンデロニトリル	7.4	98

【0022】実施例4ロドコッカス sp. HT40-6株を実施例1と同様に培養、採取し遠心分離により100mMりん酸緩衝液(pH7.5)を用いて洗浄した。沈殿菌体をそれぞれ14mMベンズアルデヒド、2-クロルベンズアルデヒド、3-クロルベンズアルデヒド、4-クロルベンズアルデヒド、4-メチルベンズアルデヒドおよび4-ヒドロキシベンズアルデヒドと14

mMシアン化カリウムを含む1.5mlの100mMりん酸緩衝液(pH7.5)に懸濁し、30℃で24時間振盪しながら反応を行った。使用した菌濃度は $OD_{610} = 1.4$ であった。生成したマンデルアミドおよびその誘導体の定量と光学純度の測定は実施例1に示した方法で行った。結果を表4に示した。

【表5】

表 4

菌 株	基 質	マンデルアミドおよび その誘導体生成量 (mM)	光学純度 S-(+)-体 (%ee)
ロドコウカス sp. HT40-6	ベンズアルデヒド +KCN	12. 7	98
	2-クロルベンズアルデヒド +KCN	12. 1	99
	3-クロルベンズアルデヒド +KCN	11. 0	98
	4-クロルベンズアルデヒド +KCN	10. 1	98
	4-メチルベンズアルデヒド +KCN	9. 8	97
	4-ヒドロキシベンズアルデ ヒド+KCN	11. 5	95

フロントページの続き

(51)Int. Cl.⁵

C 1 2 R 1:01)

識別記号

庁内整理番号

F I

技術表示箇所